

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018410

International filing date: 09 December 2004 (09.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-413629
Filing date: 11 December 2003 (11.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 10 February 2005 (10.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

13.12.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年12月11日
Date of Application:

出願番号 特願2003-413629
Application Number:

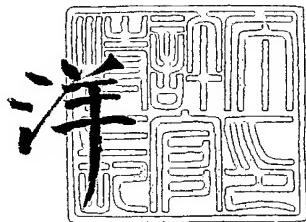
[ST. 10/C] : [JP2003-413629]

出願人 久光製薬株式会社
Applicant(s):
千葉県

2005年 1月27日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 1041
【提出日】 平成15年12月11日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 33/53
C12Q 1/68
C12N 15/52

【発明者】
【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区仁戸名町 666-2 千葉県がんセンター内
【氏名】 中川原 章

【発明者】
【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区仁戸名町 666-2 千葉県がんセンター内
【氏名】 宮崎 耕

【特許出願人】
【識別番号】 000160522
【氏名又は名称】 久光製薬株式会社

【代理人】
【識別番号】 100088155
【弁理士】
【氏名又は名称】 長谷川 芳樹

【選任した代理人】
【識別番号】 100092657
【弁理士】
【氏名又は名称】 寺崎 史朗

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 014708
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

FALS患者由来の被検体からSOD1変異体を単離し、該SOD1変異体とTRAP δとの結合能を評価することを特徴とする、FALSの臨床悪性度の判定方法。

【請求項 2】

FALS患者由来の被検体からSOD1変異体を単離し、該SOD1変異体とNEDL1およびDv11との結合能を評価することを特徴とする、FALSの臨床悪性度の判定方法。

【請求項 3】

FALS患者由来の被検体からSOD1変異体を単離し、該SOD1変異体とNEDL1との結合能を評価することを特徴とする、FALSの臨床悪性度の判定方法。

【請求項 4】

FALSの臨床悪性度の判定におけるNEDL1またはその基質の使用。

【請求項 5】

単離SOD1変異体を用いることを特徴とする請求項4に記載のNEDL1の使用。

【請求項 6】

前記基質がTRAP δまたはDv11であることを特徴とする請求項5に記載のNEDL1の使用。

【請求項 7】

SOD1変異体とNEDL1および／またはその基質との相互作用における阻害剤。

【請求項 8】

前記基質がTRAP δまたはDv11であることを特徴とする請求項7であることを特徴とする請求項7に記載の阻害剤。

【請求項 9】

神経細胞において、候補薬剤がSOD変異体とNEDL1および／またはその基質との相互作用における阻害剤であるか否かを決定することを特徴とする、FALSの治療において有用な薬剤をスクリーニングする方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】FALSの臨床悪性度の判定方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、NEDL1およびその関連因子と、SOD1変異体との相互作用に基づく、FALSの判定方法、或いは治療薬（方法）に関する。

【背景技術】

【0002】

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、脊椎、運動皮質、脳幹の運動ニューロンの変性、脱落により筋萎縮を生じる、予後不良の神経変性疾患である。現在、家族性のALS(familial lateral sclerosis:以下、FALSという)は、ALS全体の5~10%の頻度で認められるが、その一部の家系で原因遺伝子が、Cu/Znスーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)遺伝子であることが判明しており、FALS全体の約20%がSOD1遺伝子変異を原因としている。SOD1は、好気性代謝の過程で細胞内に生じる活性酵素の一種であり、スーパーオキシドを不活性化する。近年、変異型SOD1(以下、SOD1変異体といふ)が細胞内で凝集体を形成し、細胞毒性を発揮するという凝集体仮説がFALSの病因として最も有力なものとされつつある(非特許文献1)。

【0003】

本発明者らは、以前予後良好な神経芽腫と予後不良な神経芽腫との比較において、予後良好な神経芽腫で発現が増強されているNEDL1と命名した新規なHECT型ユビキチンライゲースを見出した(特許文献1)。さらに、NEDL1はSOD1変異体をユビキチン化することも見出した。

【0004】

SOD1変異体の細胞内情報伝達経路については、不明な部分が多いがSOD1変異体のみと結合し、正常SOD1(野生型SOD1)とは結合しない蛋白因子として、小胞体トランスロコン成分であるTRAP δ(translocon-associated protein complex)が報告されている(非特許文献2、非特許文献3)。

【0005】

このようにFALSの原因遺伝子であるSOD1変異体とその関連分子との間の相互作用については、解明されつつあるが、FALSの病理発生については、前記凝集体仮説が正しいとしてもそのメカニズムの全容の解明には程遠い現状である。

【特許文献1】国際公開WO 03/018842パンフレット

【非特許文献1】中野亮一、細胞工学、第20巻、第11号、1508-1512、2001

【非特許文献2】Ryen D. Fons, et al, The Journak of Cell Biology, Vol. 160, No. 4, 2003 (529-539)

【非特許文献3】Kunst C.B., et al, Nat. Genet. 15, 91-94 (1997)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

SOD1変異体とその関連分子との間の相互作用におけるNEDL1の役割について明らかにし、FALSの発症メカニズムの凝集体仮説を検証する。その過程において、各種分子間の結合、相互作用を評価すると、FALSの治療・診断につながる知見が得られる可能性がある。

【0007】

本発明は、SOD1変異体とその関連分子との結合、相互作用(NEDL1が介在するか、または介在しない)を遺伝子または蛋白レベルで解明することを1つの目的とする。さらに、本発明は、そこで得られた知見を臨床に応用すること、すなわちFALSの新たな治療剤(方法)、診断薬(方法)を提供することを別の目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、NEDL1がTRAP δとが結合し、さらにこれらはSOD1変異体と複合体を形成

して、該複合体における結合強度はFALSの臨床悪性度とほぼ比例することを見出した。さらに、同様にNEDL1がDishevel11(以下、Dv11という)と結合し、さらにこれらはSOD1変異体と複合体を形成して、該複合体における結合強度はFALSの臨床悪性度とほぼ比例することを見出した。また、NEDL1とSOD1変異体との相互作用もFALSの臨床悪性度とほぼ比例することを見出した。

【0009】

特定的には、FALS患者由来の被検体からSOD1変異体を単離し、該SOD1変異体とTRAP δとの結合能を評価することを特徴とする、FALSの臨床悪性度の判定方法が提供される。

【0010】

また、FALS患者由来の被検体からSOD1変異体を単離し、該SOD1変異体とNEDL1およびDv11との結合能を評価することを特徴とする、FALSの臨床悪性度の判定方法も提供される。

【0011】

また、FALS患者由来の被検体からSOD1変異体を単離し、該SOD1変異体とNEDL1との結合能を評価することを特徴とする、FALSの臨床悪性度の判定方法も提供される。

【0012】

要するに、本発明はFALSの臨床悪性度の判定におけるNEDL1またはその基質の使用を提供する。具体的には、その判定において、単離SOD1変異体を用いることを特徴とする。ここで、好ましくは前記基質は、TRAP δまたはDv11である。

【0013】

くわえて、SOD変異体とNEDL1および／またはその基質との相互作用における阻害剤が提供される。

【0014】

好ましくは、前記基質がTRAP δまたはDv11である。

【0015】

また、神経細胞において、候補薬剤がSOD変異体とNEDL1および／またはその基質との相互作用における阻害剤であるか否かを決定することを特徴とする、FALSの治療において有用な薬剤をスクリーニングする方法も提供される。

【発明の効果】

【0016】

本発明に従えば、FALSの原因遺伝子であるSOD1変異体とその関連分子（TRAP δ、Dv11等）との間にNEDL1が介在して、複合体が形成されることが明らかとなり、FALSの発症メカニズムとしての凝集体説が確かめられた。さらに、このような複合体におけるSOD1変異体と前記分子との結合能（NEDL1を介するか、介さないかして）がFALSの臨床悪性度に関連しているので、該結合能を評価することによって、FALSの臨床悪性度を判定することができる。

【0017】

また、上記の凝集体の形成を阻止することができれば、FALSの治療に繋がる。したがって、本発明に従えば、FALSの治療に有用であろう、SOD変異体とNEDL1および／またはその基質との相互作用における阻害剤が見出される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

以下、本発明について、好適な実施の形態を参照して、詳細に説明する。

【0019】

本発明に係るNEDL1遺伝子は、全長6200塩基（コード領域4755塩基）を有する遺伝子であり、その塩基配列を配列表の配列番号2に示す。該遺伝子がコードするNEDL1タンパク質は、1585個のアミノ酸からなり、その全長を配列表の配列番号1に示す。なお、前記塩基配列およびアミノ酸配列は、GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に受理番号AB048365として登録されている。

【0020】

図1にヒトNEDL1(hNEDL1)とマウスNEDL1(mNEDL1)のアライメント（ホモロジー解析）を出証特2005-3003364

示す。NEDL-1タンパク質は、HECT型ユビキチンリガーゼの特徴である以下のドメインを有することが分かる。すなわち、(1) N末端にC2ドメイン（カルシウム依存的に膜脂質に結合する）、(2)中央部にWWドメイン（プロリンリッチ領域との結合に関与）、(3) C末端領域にHECTドメイン（ユビキチン結合酵素E2の結合部位）である。

【0021】

NEDL1の基質を同定するために、本発明者らは、前記WWドメイン（757-1114位）を用いて、yeast two hybridスクリーニングを行った。その結果、1つの基質としてTRAP δが見出された。

【0022】

TRAP δは、小胞体膜を横切るタンパク質のトランスロケーションに関連する因子である、トランスロコン（translocon-associated protein）複合体の構成タンパク質の1つのサブユニットである。TRAP δが野生型SODとは結合しないが、SOD1変異体と結合することは既に報告されている（Kunst C.B. ら、前掲）。そこで、本発明者らは、NEDL1、TRAP δ、およびSOD1間の相互作用を調べた。具体的には、COS7細胞をこれらの発現構築物で共トランسفектし、免疫プロットおよび免疫沈降アッセイによって、解析した。

【0023】

NEDL1とTRAP δとの結合

上記の解析の結果、図2、3に示すように、NEDL1は、内因性および外因性のTRAP δと結合していることが確認される。この結合は、yeast two-hybridスクリーニングでも前記WWドメインを介していることが確認される。しかし、TRAP δは、NEDL1によってユビキチン化されない。

【0024】

NEDL1とSOD1との結合

上記の解析の結果、図4に示すように、NEDL1は、SOD1変異体と結合するが、野生型SOD1とは結合しないことが確認される。また、NEDL1と様々なSOD1変異体との結合能は、SOD1変異体が単離されたFALS患者の臨床悪性度とほぼ比例することが分かる。

【0025】

くわえて、NEDL1がSOD1変異体をユビキチン化することが確認され（図5）、そのユビキチン化の程度は、SOD1変異体が単離されたFALS患者の臨床悪性度とほぼ比例することが分かる。

【0026】

NEDL1の存在下、SOD1変異体の分解の経時変化を示したものが、図6であるが、ここでも臨床悪性度に比例して、SOD1変異体が分解していることが分かる。

【0027】

これらの結果から、SOD1変異体のユビキチン化を経由する分解には、NEDL1が介在し、臨床悪性度に比例して、分解が進行することが示される。

【0028】

TRAP δとSOD1との結合

上記の解析の結果、図7に示すように、外因性TRAP δは、SOD1変異体と結合するが、野生型SOD1とは結合しないことが確認される。また、NEDL1の場合と同様に、TRAP δと様々なSOD1変異体との結合能は、SOD1変異体が単離されたFALS患者の臨床悪性度とほぼ比例することが分かる。

【0029】

以上の結果および他の研究結果を総合して、FALSの病理発生におけるNEDL1の役割として、(1)NEDL1は、単独でまたはTRAP δと共にSOD1変異体をユビキチン化する(2)NEDL1とTRAP δは、SOD1変異体と凝集体を形成し、これがゴルジ装置の断片化を誘起、ニューロンのアポトーシスをもたらす(3)凝集体の形成は、NEDL1および／またはTRAP δの機能不全を引き起こし、それが運動ニューロン死に結びつく疾患となる(4)NEDL1／TRAP-δ／SOD1変異体の凝集体は、その正常な機能が運動ニューロンの生存に重要な分子シャペロンのような因子を取り込み、不活性化する、などであろう。

【0030】

次いで、ユビキチン化依存性蛋白分解時のNEDL1の基質を同定するために、本発明者らは、NEDL1のWWドメインを含む別のドメイン（382-1448位）を用いて、yeast two hybridスクリーニングを行った。その結果、Dv11が基質として同定された。

【0031】

ヒトDV11は、670個のアミノ酸からなるタンパク質で、以下のドメインを有する。すなわち、(1)カノニカルWnt/TCFシグナリングに必要とされるDIXドメイン、(2)PDZドメイン（Stbm、CKI結合の標的）、(3)DEPドメイン（PCPシグナリング中の膜局在化に関与）である(D.J. Sussman et al., Dev. Biol. 166, 73-86 (1994); A. Wodarz et al., Cell Dev. Biol. 14, 59-88 (1998); M. Boutros et al., Cell, 94, 109-118 (1998))であり、DEPドメインとNEDL1のWWドメインが結合するものと考えられる。

【0032】

TRAP δの場合と同様に、NEDL1、DV11およびSOD1間の相互作用を調べた。具体的には、COS7細胞をこれらの発現構築物で共トランスフェクトし、免疫プロットおよび免疫沈降アッセイによって、解析した。

【0033】NEDL1とDv11との結合

上記の解析の結果、図8に示すように、NEDL1は、Dv11と結合していることが確認される。また、NEDL1は、Dv11をユビキチン化することが確認され、（図9）さらにNEDL1の存在下、Dv11の分解の経時変化を示したもののが図10である。

【0034】Dv11とSOD1との結合

上記の解析の結果、図11に示すように、Dv11は、SOD1とNEDL1の存在下結合することが確認される。また、Dv11と様々なSOD1変異体との結合能は、SOD1変異体が単離されたFALS患者の臨床悪性度とほぼ比例することが分かる。

【0035】

ALS患者の運動ニューロンで細胞骨格異常が報告されており、NEDL1介在Dv11分解に対する前記のSOD1変異体の影響が運動ニューロン死に関与していることは可能である (Luo, Z.G. et al., Neuron 35, 489-505 (2002))。

【0036】結論

神経細胞E3ユビキチンリガーゼであるNEDL1は、TRAP δと結合（相互作用）するが、Dv11とも結合し、これをユビキチン化して分解する。NEDL1は、このようにSOD1変異体、DV11、TRAP δと複合体を形成するので、特にユビキチン介在の分解を逃れたSOD1変異体と巨大な凝集体を形成する。標的タンパク質（基質）であるDV11またはTRAP δの活性に影響を与えるNEDL1の機能は、SOD1変異体によって調節される。これら個々の相互作用がすべて、FALSの病理発生に関係しているようである。したがって、前記複合体もしくは巨大凝集体形成の分子メカニズムの解明は、ALSにおける運動ニューロン死を説明し、ひいてはALSに対する新たな治療薬・治療方法の展望を開くことになる。図12に、本発明において得られた知見に基づく、FALS病理発生におけるSOD1変異体とその関連分子との間の相互作用の模式図を示す。

【0037】FALSの治療剤および治疗方法

上記のような考察に基づいて、本発明によれば、SOD1変異体とNEDL1および／またはその基質との相互作用における阻害剤の開発が提供される。阻害剤としての候補薬剤は、核酸、タンパク質、低分子化合物（化学合成または天然由来）、タンパク質以外の高分子化合物などである。

【0038】

このような阻害剤のスクリーニング方法としては、Two-Hybrid System(例えば、Gyuris, J. Cell, 1993, 75, 791-803; Golemis, E. A., Current Protocols in Molecular Bio

logy (John Wiley & Sons, Inc.) 1996, Ch. 20.0-20.1) が挙げられる。また、免疫学的手法で、阻害剤のスクリーニング法を実施することもできる。具体的には、細胞（神経細胞）内でSOD1変異体（特に、臨床悪性度の高いもの）とNEDL1および／またはその基質を発現させ、一定時間候補薬剤と共に培養した後、細胞を粉碎して細胞溶解液を調製する。一方の分子に対する抗体で免疫沈降させ、沈殿中に含まれる他方の分子（それ以外）を免疫学的手法（免疫プロット等）で検出ないし、定量することで、候補薬剤の各分子の相互作用に及ぼす影響を検出できる。ここで、上記培養系に適当なアゴニストと候補薬剤とを同時に添加して、上記アッセイを行い、候補薬剤を含まない細胞からの免疫沈降物と比較することで阻害剤のスクリーニングが可能である。

【0039】

上記のスクリーニング方法で同定されたSOD1変異体とNEDL1および／またはその基質における阻害剤であるタンパク質等は、FALSを患う患者またはその可能性のある患者に経口的に、または非経口的に投与する。この目的で、そのタンパク質を薬学的組成物として調製する。これは、有効量の該結合阻害を薬学的に許容される担体、もしくは希釈剤と混合して、適当な剤形とする。投与に適した剤形は、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、カプセル剤、坐剤、注射剤等である。

【実施例】

【0040】

(方法)

(ヒトNEDL1 cDNAのクローニング)

ヒトNEDL1 cDNAのクローニングについては、国際公開WO 03/018842パンフレット (PCT/JP02/08524) に詳述してあるが、本発明では、以下のようにして、実施した。すなわち、フォワード・プライマー (5' -GGTTTTAGGCCTGGCCGCC-3'、配列番号3) およびリバース・プライマー (5' -CAATGAGGTACATGCCAATCC-3'、配列番号4) を使用し、ヒト胎児脳 (Stratagene社製) をテンプレートとして、NEDL1cDNA (ヒト神経芽細胞種からのcDNAライブラリー) の5' 部分を増幅した。全長ヒトNEDL1 cDNAは、PCR増幅断片 (ヌクレオチド1位 (翻訳開始部位) ~ 68位) とKIAA0322 cDNA ((財) かずさDNA研究所、T. Nagase氏より寄贈) と融合させて、作成した。

【0041】

(細胞培養およびトランスフェクション)

細胞は、10%熱不活性化ウシ胎児血清 (FBS、Life Technologies, Inc.) 、ペニシリン (100IU/ml) 、ストレプトマイシン (100 μg/ml) を添加したRPMI1640培地で増殖した。COS7およびNeuro2a細胞は、10%熱不活性化ウシ胎児血清とペニシリン (100IU/ml) /ストレプトマイシン (100 μg/ml) を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium: DMEM) に維持した。細胞は、空气中水飽和5%炭酸ガス雰囲気下、37°Cで培養した。各発現プラスミドの共トランスフェクションは、製造者の指示書に従い、リポフェクトアミン (LipofectAMINE、Life Technologies, Inc.社製) を用いて実施した。ある種の実験では、トランスフェクトした細胞をMG-132を用いて、終濃度40 μMで30分間処理した。

○

【0042】

(Yeast Two-Hybrid Screening)

スクリーニングは、ヒト胎児脳 (1次スクリーニング) およびヒト成人脳 (2次スクリーニング) から得られたcDNAライブラリーを用いる、Gal4-based matchmaker two-hybrid system (Clonetech社製) を使用して実行した。Saccharomyces cereviciae CG1945細胞をpAS2-1-NEDL1-1 (757-1114位、1次スクリーニング) またはpAS2-1-NEDL1-2 (382-1448位、2次スクリーニング) で形質転換した。これらの発現ベクターは共にLacZの転写のみを活性化しない。形質転換体をさらに前記cDNAライブラリーで形質転換した。LacZ陽性コロニーを選択した。これら陽性コロニーからプラスミドDNAを抽出して、その核酸配列を決定した。

【0043】

(インビトロユビキチン化アッセイ)

インビトロユビキチン化アッセイは、以下のように実施した。0.5 μgの精製GST融合蛋白、0.25 μg酵母E1(Boston Biochem社製)、E2sを発現するE. coliからの粗細胞溶解物1 μlおよび10 μgウシUb(Sigma社製)を250 mM Tris-HCl(pH7.6)、1.2 M NaCl、50 mM ATP、10 mM MgCl₂、および30 mM ジチオスレイトール中でインキュベートした。30°Cで2時間後、SDSサンプルバッファを添加して、反応を停止した。試料をSDS-PAGEで分析し、メンブランに移し、抗ユビキチンモノクローナル抗体(Medical Biological Laboratories社製)で免疫プロットした。

【0044】

(発現構築物)

ヘマグルチニンタグおよび(His6)タグされたユビキチンの哺乳動物用発現プラスミドは、D. Bohmann氏より寄贈された。全長NEDL1 cDNAを哺乳動物用発現プラスミドpEF1/His(Invitrogen社製)またはpIRESpuro2(Clontech社製)に導入した。野生型または変異型のSO D1をコードするcDNAをFLAGもしくはMycエピトープタグ配列のカルボキシ末端に接合し、pIRESpuro2にサブクロニーニングした。同様に、FLAGもしくはMycエピトープタグをTRAP δのカルボキシ末端に接合した。さらに、FLAGもしくはMycエピトープタグをDv11のアミノ末端に接合した。コード配列は、自動DNA塩基配列決定によって確認した。

【0045】

(免疫沈降およびウエスタンプロット分析)

ウサギでNEDL1オリゴペプチド(460-482位)とTRAP δオリゴペプチド(93-126位)に対して、それぞれ抗NEDL1抗体と抗TRAP δ抗体を作成した。免疫沈降実験では、COS7細胞またはNeuro2a細胞を様々な組合せで、発現プラスミドを用いて共トラスフェクトした。48時間後、プロテアーゼ阻害剤カクテル(Sigma社製)を追加したTNEバッファ(10 mM Tris-HCl pH 7.8、150 mM NaCl、1% NP-40、1 mM EDTA、1 mM PMSF)中で細胞溶解した。全細胞溶解物を抗NEDL1抗体、抗FLAG抗体(M2、Sigma社製)または抗Myc抗体(9B11、Cell Signaling Technology社製)を用いて、免疫沈降させた。免疫複合体をGTP結合タンパク質セファロースビーズ上で回収し、Laemmliサンプルバッファ中で沸騰させて溶出し、SDSポリアミドゲルで電気泳動し、エレクトロプロットによりポリビニリデンジフルオリドメンブラン(Immobilon、Millipore社製)に移した。ユビキチン化実験では、細胞溶解をRIPAバッファ(10 mM Tris-HCl pH7.4、150 mM NaCl、1% NP-40、0.1% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、1 mM EDTA)中で実施し、その後強力な超音波処理を行った。メンブレンを第1抗体でプローブし、それからホースラディッシュペルオキシダーゼ(Jackson Immuno Research Laboratories/Southern Biotechnology Associates, Inc. 製)で標識した二次抗体とともにインキュベートした。免疫反応性のバンドをECL増強化学発光法(Amersham Pharmacia Biotech社)によって検出した。タンパク質分解実験では、Neuro2細胞を所定の発現プラスミドでトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞をシクロヘキシミド(Sigma社製)の50 μg/ml濃度で所定時間処理した。その後、全細胞溶解物の等量(50 μg)をウエスタンプロットにかけ、続いてIntelligent Quantifier software(Bio Image社製)を用いて、定量した。

【0046】

(実施例1) NEDL1とTRAP δとの結合

COS7細胞を図2に示した発現プラスミド(NEDL1およびFLAG-TRAP δ)で共トランスフェクトした。全細胞溶解物を抗FLAG抗体(第1パネル)または抗NEDL1抗体(第2パネル)で免疫沈降(IP)させた。免疫沈降物を図に示した抗体を用いて免疫プロット(IB)した。全細胞溶解物を各タンパク質の発現レベルについて、免疫プロット解析した(第3パネル、第4パネル)。検出は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ共役された二次抗体を用いて行った。COS7細胞をxpress-NEDL1発現プラスミドでトランスフェクトし、同様の実験を行った(図3)。これらの結果から、NEDL1とTRAP δとの結合が外因性TRAP δについて確認された。

【0047】

(実施例 2) NEDL1とSOD1変異体との結合

NEDL1およびFLAGタグSOD1変異体または野生型SOD1を過剰発現するCOS7細胞からの全細胞溶解物を抗FLAG抗体（第1パネル）または抗NEDL1抗体（第2パネル）を用いて、免疫沈降させ、それから抗NEDL1抗体または抗FLAG抗体を用いて、免疫プロットした。NEDL1またはFLAGタグSOD1変異体の発現を抗NEDL1抗体（第3パネル）または抗FLAG抗体（第4パネル）を用いて、それぞれ解析した（図4）。発症後、急速な臨床経過を辿り、患者が1.5年以内に死亡するSOD1変異体（C6F、A4V）は、NEDL1と強く結合していることが分かる（図4、レーン3、4）。一方、発症後緩徐な臨床経過を示す、SOD1変異体（L126S、H46R、D90A）は、ほとんどNEDL1と結合をしていないことが分かる（図4、レーン11～13）。発症後特異的な神経症状を示す変異である、SOD1変異体（G93A）は、NEDL1と中程度の結合をしていることが分かる。また、野生型SOD1とNEDL1は結合しない（共沈しない）ことも分かる（レーン2）。

【0048】

(実施例 3) TRAP δとSOD1変異体との結合

COS7細胞をFLAGタグTRAP δおよびMycタグSOD1変異体またはMycタグ野生型SOD1をコードする発現プラスミドで一過的に共トランスフェクトした。全細胞溶解物を抗Myc抗体（第1パネル）または抗FLAG抗体（第2パネル）を用いて、免疫沈降させ、それから抗FLAG抗体または抗Myc抗体を用いて、免疫プロットした（図7）。FLAGタグTRAP δまたはMycタグSOD1変異体の発現を抗FLAG抗体（第3パネル）または抗Myc抗体（第4パネル）を用いて、それぞれ解析した。発症後、急速な臨床経過を辿り、患者が1.5年以内に死亡するSOD1変異体（A4V）は、TRAP δと強く結合していることが分かる（図7、レーン4）。一方、発症後緩徐な臨床経過を示す、SOD1変異体（H46R）は、ほとんどTRAP δと結合をしていないことが分かる（レーン6）。また、野生型SOD1とTRAP δは結合しない（共沈しない）ことも分かる（レーン3）。

【0049】

(実施例 4) NEDL1依存性ユビキチン化

NEDL1は、SOD1変異体をSOD1のタイプに依存する様式でユビキチン化した。COS7細胞を図5に示した発現プラスミドを用いて、一過的に共トランスフェクトした。トランスフェクトしたCOS7細胞からの全細胞溶解物を抗Myc抗体で免疫沈降させて、抗ユビキチン抗体を用いて免疫プロットした（上部パネル）。ユビキチン化の程度は、ほぼFALSの臨床重症度（A4V>G93A>H46R）に比例した。全細胞溶解物を抗NEDL1抗体で免疫プロットし、トランスフェクトしたNEDL1の発現を確認した（下部パネル）。図中、矢印は、ユビキチン化されていないSOD1の位置を示し、左側に分子量マーカーの位置を示してある。

【0050】

(実施例 5) NEDL1の存在下、または不在下の野生型SOD1およびSOD1変異体の半減期シクロヘキシジンを添加後（終濃度50 μg/ml）、図6に示したような異なる時点で回収した、空ベクターまたはNEDL1発現プラスミドでトランスフェクトしたNeuro2a細胞の溶解物を抗FLAG抗体で免疫プロットして、SOD1蛋白レベルを分析した。SOD1変異体は、野生型SOD1より迅速に分解された。NEDL1は、野生型SOD1の分解に影響を及ぼさなかった。SOD1変異体タンパク質の分解は、促進され、NEDL1の存在下、SOD1変異体タンパク質の半減期は、ほぼFALSの重症度（A4V>G93A>H46R）に比例して減少してゆくことが分かる。

【0051】

(実施例 6) NEDL1とDv11との結合

COS7細胞中、MycタグDv11をNEDL1とともに過剰発現させた。全細胞溶解物を抗NEDL1抗体で免疫沈降させ、続いて抗Myc抗体を用いて免疫プロットした（図8の上部パネル）。MycタグDv11の発現レベルを抗Myc抗体を用いて、免疫プロットし解析した（下部パネル）

(実施例 7) Dv11のNEDL1依存性ユビキチン化

NEDL1は、COS7細胞中Dv11をユビキチン化した。COS7細胞を図9に示した発現プラスミドを用いて、一過的に共トランスフェクトした。トランスフェクトしたCOS7細胞からの全細胞溶解物を抗Myc抗体で免疫沈降させて、抗ユビキチン抗体を用いて免疫プロットした（

上部パネル）。全細胞溶解物を抗xpress-NEDL1抗体（中段パネル）または抗Myc抗体（下段パネル）で免疫プロットし、トランスフェクトしたNEDL1またはMyc-Dv11の発現を確認した。

【0052】

(実施例8) NEDL1によるDv11の分解

Neuro2a細胞をFLAGタグDv11用の発現プラスミドを用いて、NEDL1発現プラスミドの存在下、または不在のもとでトランスフェクトした。トランスフェクト細胞をシクロヘキシジン添加後（終濃度50μg/ml）、図10に示したような異なる時点で回収した。Neuro2a細胞溶解物を抗FLAG抗体で免疫プロットして、Dv11蛋白レベルを分析した。NEDL1の存在下、FLAG-Dv11の半減期は、顕著に減少した。

【0053】

(実施例9) Dv11とSOD1変異体との結合

COS7細胞を図11に示した発現プラスミドで一過的に共トランスフェクトした。全細胞溶解物を抗Myc抗体で、免疫沈降させ、それから抗FLAG抗体または抗Myc抗体を用いて、免疫プロットした。NEDL1の存在下、Dv11とSOD1変異体との結合が強まっていることが分かる（図11、レーン4）。結合能は、ほぼFALSの重症度（A4V>G93A>H46R）に比例して減少してゆくことも分かる。

【産業上の利用可能性】

【0054】

以上説明したように、本発明は、NEDL1とSOD1変異体との結合能、或いはNEDL1存在下、または非存在下でのNEDL1関連因子とSOD1変異体との結合能を評価することによって、前記SOD1変異体が単離されたFALS患者の臨床悪性度の判定を可能にし、FALSの診断に役に立つ。

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図1】図1は、ヒトNEDL1(hNEDL1)とマウスNEDL1(mNEDL1)との間の保存的アミノ酸配列のアライメントを示す図である。図中、右欄番号は、イニシエーターであるメチオニンからの塩基数を表す。C2ドメイン、WWドメインおよびHECTドメインがそれぞれ示されている。

【図2】NEDL1とTRAP-δとの結合を示す免疫プロットした電気泳動図（免疫プロット図）である。

【図3】NEDL1と内因性TRAP-δとの結合を示す免疫プロットした電気泳動図である。

【図4】NEDL1とSOD1変異体との結合を示す免疫プロット図である。

【図5】NEDL1の野生型SOD1およびSOD1変異体に対するユビキチン化を示す免疫プロット図である。

【図6】NEDL1の存在下、SOD1変異体および野生型SOD1の分解の経時変化を示す免疫プロット図である。

【図7】SOD1変異体と外因性TRAP δとの結合を示す免疫プロット図である。

【図8】NEDL1とDv11との結合を示す免疫プロット図である。

【図9】NEDL1のDv11に対するユビキチン化を示す免疫プロット図である。

【図10】NEDL1の存在下、Dv11の分解の経時変化を示す免疫プロット図である。

【図11】NEDL1の存在下、SOD1変異体とDv11との結合を示す免疫プロット図である。

【図12】FALS病理発生におけるSOD1変異体とその関連分子との間の相互作用の模式図を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc.

<120> Method for determining clinical malignancy of FALS

<130> JP03-1448HM

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223>

<400> 1

Met Ala Ser Pro Ser Arg Asn Ser Gln Ser Arg Arg Arg Cys Lys Glu
1 5 10 15

Pro Leu Arg Tyr Ser Tyr Asn Pro Asp Gln Phe His Asn Met Asp Leu
20 25 30

Arg Gly Gly Pro His Asp Gly Val Thr Ile Pro Arg Ser Thr Ser Asp
35 40 45

Thr Asp Leu Val Thr Ser Asp Ser Arg Ser Thr Leu Met Val Ser Ser
50 55 60

Ser Tyr Tyr Ser Ile Gly His Ser Gln Asp Leu Val Ile His Trp Asp
65 70 75 80

Ile Lys Glu Glu Val Asp Ala Gly Asp Trp Ile Gly Met Tyr Leu Ile
85 90 95

Asp Glu Val Leu Ser Glu Asn Phe Leu Asp Tyr Lys Asn Arg Gly Val
100 105 110

Asn Gly Ser His Arg Gly Gln Ile Ile Trp Lys Ile Asp Ala Ser Ser
115 120 125

Tyr Phe Val Glu Pro Glu Thr Lys Ile Cys Phe Lys Tyr Tyr His Gly
 130 135 140

Val Ser Gly Ala Leu Arg Ala Thr Thr Pro Ser Val Thr Val Lys Asn
 145 150 155 160

Ser Ala Ala Pro Ile Phe Lys Ser Ile Gly Ala Asp Glu Thr Val Gln
 165 170 175

Gly Gln Gly Ser Arg Arg Leu Ile Ser Phe Ser Leu Ser Asp Phe Gln
 180 185 190

Ala Met Gly Leu Lys Lys Gly Met Phe Phe Asn Pro Asp Pro Tyr Leu
 195 200 205

Lys Ile Ser Ile Gln Pro Gly Lys His Ser Ile Phe Pro Ala Leu Pro
 210 215 220

His His Gly Gln Glu Arg Arg Ser Lys Ile Ile Gly Asn Thr Val Asn
 225 230 235 240

Pro Ile Trp Gln Ala Glu Gln Phe Ser Phe Val Ser Leu Pro Thr Asp
 245 250 255

Val Leu Glu Ile Glu Val Lys Asp Lys Phe Ala Lys Ser Arg Pro Ile
 260 265 270

Ile Lys Arg Phe Leu Gly Lys Leu Ser Met Pro Val Gln Arg Leu Leu
 275 280 285

Glu Arg His Ala Ile Gly Asp Arg Val Val Ser Tyr Thr Leu Gly Arg
 290 295 300

Arg Leu Pro Thr Asp His Val Ser Gly Gln Leu Gln Phe Arg Phe Glu
 305 310 315 320

Ile Thr Ser Ser Ile His Pro Asp Asp Glu Glu Ile Ser Leu Ser Thr
 325 330 335

Glu Pro Glu Ser Ala Gln Ile Gln Asp Ser Pro Met Asn Asn Leu Met
 340 345 350

Glu Ser Gly Ser Gly Glu Pro Arg Ser Glu Ala Pro Glu Ser Ser Glu
 355 360 365

Ser Trp Lys Pro Glu Gln Leu Gly Glu Gly Ser Val Pro Asp Arg Pro
 370 375 380

Gly Asn Gln Ser Ile Glu Leu Ser Arg Pro Ala Glu Glu Ala Ala Val
 385 390 395 400

Ile Thr Glu Ala Gly Asp Gln Gly Met Val Ser Val Gly Pro Glu Gly
 405 410 415

Ala Gly Glu Leu Leu Ala Gln Val Gln Lys Asp Ile Gln Pro Ala Pro
 420 425 430

Ser Ala Glu Glu Leu Ala Glu Gln Leu Asp Leu Gly Glu Glu Ala Ser
 435 440 445

Ala Leu Leu Leu Glu Asp Gly Glu Ala Pro Ala Ser Thr Lys Glu Glu
 450 455 460

Pro Leu Glu Glu Glu Ala Thr Thr Gln Ser Arg Ala Gly Arg Glu Glu
 465 470 475 480

Glu Glu Lys Glu Gln Glu Glu Gly Asp Val Ser Thr Leu Glu Gln
 485 490 495

Gly Glu Gly Arg Leu Gln Leu Arg Ala Ser Val Lys Arg Lys Ser Arg
 500 505 510

Pro Cys Ser Leu Pro Val Ser Glu Leu Glu Thr Val Ile Ala Ser Ala
 515 520 525

Cys Gly Asp Pro Glu Thr Pro Arg Thr His Tyr Ile Arg Ile His Thr
 530 535 540

Leu Leu His Ser Met Pro Ser Ala Gln Gly Gly Ser Ala Ala Glu Glu
 545 550 555 560

Glu Asp Gly Ala Glu Glu Glu Ser Thr Leu Lys Asp Ser Ser Glu Lys
 565 570 575

Asp Gly Leu Ser Glu Val Asp Thr Val Ala Ala Asp Pro Ser Ala Leu
 580 585 590

Glu Glu Asp Arg Glu Glu Pro Glu Gly Ala Thr Pro Gly Thr Ala His
 595 600 605

Pro Gly His Ser Gly Gly His Phe Pro Ser Leu Ala Asn Gly Ala Ala
 610 615 620

Gln Asp Gly Asp Thr His Pro Ser Thr Gly Ser Glu Ser Asp Ser Ser
 625 630 635 640

Pro Arg Gln Gly Gly Asp His Ser Cys Glu Gly Cys Asp Ala Ser Cys
 645 650 655

Cys Ser Pro Ser Cys Tyr Ser Ser Ser Cys Tyr Ser Thr Ser Cys Tyr

660	665	670
Ser Ser Ser Cys Tyr Ser Ala Ser Cys Tyr Ser Pro Ser Cys Tyr Asn		
675	680	685
Gly Asn Arg Phe Ala Ser His Thr Arg Phe Ser Ser Val Asp Ser Ala		
690	695	700
Lys Ile Ser Glu Ser Thr Val Phe Ser Ser Gln Asp Asp Glu Glu Glu		
705	710	715
Glu Asn Ser Ala Phe Glu Ser Val Pro Asp Ser Met Gln Ser Pro Glu		
725	730	735
Leu Asp Pro Glu Ser Thr Asn Gly Ala Gly Pro Trp Gln Asp Glu Leu		
740	745	750
Ala Ala Pro Ser Gly His Val Glu Arg Ser Pro Glu Gly Leu Glu Ser		
755	760	765
Pro Val Ala Gly Pro Ser Asn Arg Arg Glu Gly Glu Cys Pro Ile Leu		
770	775	780
His Asn Ser Gln Pro Val Ser Gln Leu Pro Ser Leu Arg Pro Glu His		
785	790	795
His His Tyr Pro Thr Ile Asp Glu Pro Leu Pro Pro Asn Trp Glu Ala		
805	810	815
Arg Ile Asp Ser His Gly Arg Val Phe Tyr Val Asp His Val Asn Arg		
820	825	830
Thr Thr Thr Trp Gln Arg Pro Thr Ala Ala Ala Thr Pro Asp Gly Met		
835	840	845
Arg Arg Ser Gly Ser Ile Gln Gln Met Glu Gln Leu Asn Arg Arg Tyr		
850	855	860
Gln Asn Ile Gln Arg Thr Ile Ala Thr Glu Arg Ser Glu Glu Asp Ser		
865	870	875
Gly Ser Gln Ser Cys Glu Gln Ala Pro Ala Gly Gly Gly Gly Gly		
885	890	895
Gly Ser Asp Ser Glu Ala Glu Ser Ser Gln Ser Ser Leu Asp Leu Arg		
900	905	910
Arg Glu Gly Ser Leu Ser Pro Val Asn Ser Gln Lys Ile Thr Leu Leu		
915	920	925

Leu Gln Ser Pro Ala Val Lys Phe Ile Thr Asn Pro Glu Phe Phe Thr
 930 935 940
 Val Leu His Ala Asn Tyr Ser Ala Tyr Arg Val Phe Thr Ser Ser Thr
 945 950 955 960
 Cys Leu Lys His Met Ile Leu Lys Val Arg Arg Asp Ala Arg Asn Phe
 965 970 975
 Glu Arg Tyr Gln His Asn Arg Asp Leu Val Asn Phe Ile Asn Met Phe
 980 985 990
 Ala Asp Thr Arg Leu Glu Leu Pro Arg Gly Trp Glu Ile Lys Thr Asp
 995 1000 1005
 Gln Gln Gly Lys Ser Phe Phe Val Asp His Asn Ser Arg Ala Thr Thr
 1010 1015 1020
 Phe Ile Asp Pro Arg Ile Pro Leu Gln Asn Gly Arg Leu Pro Asn His
 1025 1030 1035 1040
 Leu Thr His Arg Gln His Leu Gln Arg Leu Arg Ser Tyr Ser Ala Gly
 1045 1050 1055
 Glu Ala Ser Glu Val Ser Arg Asn Arg Gly Ala Ser Leu Leu Ala Arg
 1060 1065 1070
 Pro Gly His Ser Leu Val Ala Ala Ile Arg Ser Gln His Gln His Glu
 1075 1080 1085
 Ser Leu Pro Leu Ala Tyr Asn Asp Lys Ile Val Ala Phe Leu Arg Gln
 1090 1095 1100
 Pro Asn Ile Phe Glu Met Leu Gln Glu Arg Gln Pro Ser Leu Ala Arg
 1105 1110 1115 1120
 Asn His Thr Leu Arg Glu Lys Ile His Tyr Ile Arg Thr Glu Gly Asn
 1125 1130 1135
 His Gly Leu Glu Lys Leu Ser Cys Asp Ala Asp Leu Val Ile Leu Leu
 1140 1145 1150
 Ser Leu Phe Glu Glu Glu Ile Met Ser Tyr Val Pro Leu Gln Ala Ala
 1155 1160 1165
 Phe His Pro Gly Tyr Ser Phe Ser Pro Arg Cys Ser Pro Cys Ser Ser
 1170 1175 1180
 Pro Gln Asn Ser Pro Gly Leu Gln Arg Ala Ser Ala Arg Ala Pro Ser
 1185 1190 1195 1200

Pro Tyr Arg Arg Asp Phe Glu Ala Lys Leu Arg Asn Phe Tyr Arg Lys
 1205 1210 1215

Leu Glu Ala Lys Gly Phe Gly Gln Gly Pro Gly Lys Ile Lys Leu Ile
 1220 1225 1230

Ile Arg Arg Asp His Leu Leu Glu Gly Thr Phe Asn Gln Val Met Ala
 1235 1240 1245

Tyr Ser Arg Lys Glu Leu Gln Arg Asn Lys Leu Tyr Val Thr Phe Val
 1250 1255 1260

Gly Glu Glu Gly Leu Asp Tyr Ser Gly Pro Ser Arg Glu Phe Phe
 1265 1270 1275 1280

Leu Leu Ser Gln Glu Leu Phe Asn Pro Tyr Tyr Gly Leu Phe Glu Tyr
 1285 1290 1295

Ser Ala Asn Asp Thr Tyr Thr Val Gln Ile Ser Pro Met Ser Ala Phe
 1300 1305 1310

Val Glu Asn His Leu Glu Trp Phe Arg Phe Ser Gly Arg Ile Leu Gly
 1315 1320 1325

Leu Ala Leu Ile His Gln Tyr Leu Leu Asp Ala Phe Phe Thr Arg Pro
 1330 1335 1340

Phe Tyr Lys Ala Leu Leu Arg Leu Pro Cys Asp Leu Ser Asp Leu Glu
 1345 1350 1355 1360

Tyr Leu Asp Glu Glu Phe His Gln Ser Leu Gln Trp Met Lys Asp Asn
 1365 1370 1375

Asn Ile Thr Asp Ile Leu Asp Leu Thr Phe Thr Val Asn Glu Glu Val
 1380 1385 1390

Phe Gly Gln Val Thr Glu Arg Glu Leu Lys Ser Gly Gly Ala Asn Thr
 1395 1400 1405

Gln Val Thr Glu Lys Asn Lys Lys Glu Tyr Ile Glu Arg Met Val Lys
 1410 1415 1420

Trp Arg Val Glu Arg Gly Val Val Gln Gln Thr Glu Ala Leu Val Arg
 1425 1430 1435 1440

Gly Phe Tyr Glu Val Val Asp Ser Arg Leu Val Ser Val Phe Asp Ala
 1445 1450 1455

Arg Glu Leu Glu Leu Val Ile Ala Gly Thr Ala Glu Ile Asp Leu Asn

1460

1465

1470

Asp Trp Arg Asn Asn Thr Glu Tyr Arg Gly Gly Tyr His Asp Gly His
 1475 1480 1485

Leu Val Ile Arg Trp Phe Trp Ala Ala Val Glu Arg Phe Asn Asn Glu
 1490 1495 1500

Gln Arg Leu Arg Leu Leu Gln Phe Val Thr Gly Thr Ser Ser Val Pro
 1505 1510 1515 1520

Tyr Glu Gly Phe Ala Ala Leu Arg Gly Ser Asn Gly Leu Arg Arg Phe
 1525 1530 1535

Cys Ile Glu Lys Trp Gly Lys Ile Thr Ser Leu Pro Arg Ala His Thr
 1540 1545 1550

Cys Phe Asn Arg Leu Asp Leu Pro Pro Tyr Pro Ser Tyr Ser Met Leu
 1555 1560 1565

Tyr Glu Lys Leu Leu Thr Ala Val Glu Glu Thr Ser Thr Phe Gly Leu
 1570 1575 1580

Glu
 1585

<210> 2

<211> 6200

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223>

<400> 2

gggttttagg cctggccgcc atggcgtctc cttctagaaa ctcccagagc cgacgcccgt 60
 gcaaggagcc gctccgatac agctacaacc ccgaccagg ccacaacatg gacctcaggg 120
 gcggccccca cgatggcgtc accattcccc gctccaccag cgacactgac ctggcacct 180
 cggacagccg ctccacgctc atggtcagca gctcctacta ttccatcggt cactctcagg 240
 acctggtcat ccactgggac ataaaggagg aagtggacgc tggggactgg attggcatgt 300
 acctcattga tgaggtcttg tccgaaaact ttctggacta taaaaaccgt ggagtcaatg 360
 gttctcatcg gggccagatc atctggaga tcgatgccag ctcgtacttt gtggAACCTG 420
 aaactaagat ctgttcaaa tactaccatg gagtgagtgg ggccctgcga gcaaccaccc 480
 ccagtgtcac ggtcaaaaac tcggcagctc ctatTTTAA aagcattggt gctgatgaga 540
 ccgtccaagg acaaggaagt cggaggctga tcagcttctc tctctcagat ttccaagcca 600
 tggggttgaa gaaagggatg ttttcaacc cagaccctta tctgaagatt tccattcagc 660
 ctggaaaca cagcatcttc cccgccctcc ctcaccatgg acaggagagg agatccaaga 720
 tcataggcaa caccgtgaac cccatctggc aggccgagca attcagttt gtgtccttgc 780
 ccactgacgt gctggaaatt gaggtgaagg acaagttgc caagagccgc cccatcatca 840

agcgcttctt gggaaagctg tcgatgcccg ttcaaagact cctggagaga cacgccatag 900
 gggatagggt ggtcagctac acacttggcc gcaggcttc aacagatcat gtgagtggac 960
 agctgcaatt ccgattttag atcacttcct ccatccaccc agatgatgag gagatttccc 1020
 tgagtaccga gcctgagtca gcccaaattc aggacagccc catgaacaac ctgatggaaa 1080
 gcggcagtgg ggaacctcgg tctgagggcac cagagtctc tgagagctgg aagccagagc 1140
 agctgggtga gggcagtgtc cccgatcgac cagggAACCA aagcatagag cttccagac 1200
 cagctgagga agcagcagtc atcacggagg caggagacca gggcatggc tctgtggac 1260
 ctgaaggggc tgggagctc ctggcccagg tgaaaaagga catccagcct gcccccagtg 1320
 cagaagagct ggccgagcag ctggacctgg gtgaggaggc atcagcactg ctgctggaag 1380
 acggtaagc cccagccagc accaaggagg agcccttgga ggaggaagca acgacccaga 1440
 gccgggctgg aagggaaagg gaggagaagg agcaggagga ggagggagat gtgtccaccc 1500
 tggagcaggg agagggcagg ctgcagctgc gggcctcggt gaagagaaaa agcaggccct 1560
 gtccttgcc tgttcccgag ctggagacgg tgcgtcgac agcctgcggg gaccccgaga 1620
 ccccgccggac acactacatc cgcatccaca ccctgctgca cagcatgccc tccgcccagg 1680
 gcggcagcgc ggcagaggag gaggacggcg cgaggagga gtccaccctc aaggactcct 1740
 cggagaagga tgggctcagc gaggtggaca cgttggccgc tgaccgtct gcccggaaag 1800
 aggacagaga agagcccgag ggggctactc caggcacggc gcaccctggc cactccggg 1860
 gccacttccc cagcctggcc aatggcgcgg cccaggatgg cgacacgcac cccagcaccg 1920
 ggagcgagag cgactccagc cccaggcaag gccccggacca cagttgcgag ggctgtgacg 1980
 cgtcctgctg cagcccctcg tgctacagct ccctgctgcta cagcacgtcc tgctacagca 2040
 gctcgtgcta cagcgcctcg tgctacagcc ccctctgcta caacggcaac aggttcgcca 2100
 gccacacgcg ctttcctcc gtggacagcg ccaagatctc cgagagcacg gtcttcct 2160
 cgcaagacga cgaggaggag gagaacagcg ctttcgagtc ggtacccgac tccatgcaga 2220
 gccctgagct ggacccggag tccacgaacg gcgcgtggcc gtggcaagac gagctggccg 2280
 cccctagcgg gcacgtggaa agaagcccg aaggcttggaa atccccgtg gcaggtccaa 2340
 gcaatcggag agaaggtgaa tgttctatac tccataattc ccagccagta agccagctc 2400
 cttccctgag gcctgaacat catcaactacc caacaatcga tgaccctt ccaccaaact 2460
 gggagctcg aattgacagc cacggggccg tcttttatgt ggaccacgtg aaccgcacaa 2520
 ccacctggca gcgtccgacg gcagcagcca ccccgatgg catgggaga tcgggttcca 2580
 tccagcagat ggagcaactc aacaggcggt atcaaaacat tcagcgaacc attgcaacag 2640
 agaggtccga agaagattct ggcagccaaa gctgcgagca agcccgacgg gggaggccg 2700
 gaggtggagg gagtgactca gaagccgaat cttccctgac cagcttagat ctaaggagag 2760
 aggggtact ttctccctgat aactcacaaa aaatcacctt gctgctgcag tccccagcgg 2820
 tcaagttcat caccaacccc gagttttca ctgtgctaca tgccaaattt agtgcctacc 2880
 gagtcttcac cagtagcacc tgcttaaagc acatgattct gaaagtccga cggatgctc 2940
 gcaatttiga acgttaccag cacaaccggg acttggtggaa tttcatcaac atgttcgcag 3000
 acactcgctt ggaactgccc cggggctggg agatcaaaac ggaccagcag ggaaagtctt 3060
 tttctgttga ccacaacagt cgagcttacca ctttatttga ccccgatgc ccttccaga 3120
 acggctgtct tcccaatcat ctaactcacc gacagcacct ccagaggctc cgaagttaca 3180
 ggcgtggaga ggcctcagaa gttcttagaa acagaggagc ctcttactg gccaggccag 3240
 gacacagtt agtagctgtt attcgaagcc aacatcaaca tgagtcttgc ccaactggcat 3300
 ataatgacaa gattgtggca tttcttcgaa agccaaacat tttgaaatg ctgcaagagc 3360
 gtcagccaaat ctttagcaaga aaccacacac tcagggagaa aatccattac attcggactg 3420
 agggtaatca cggcttgcgag aagttgttgc tctgtgttgc ttcgtgttgc 3480
 tctttgttgcgaa agagattatg tcctacgttcc ccctgcaggc tgccttccac cttgggtata 3540
 gcttcttc cccgttca ccctgttcc cacctcagaa ctcccccaggt ttacagagag 3600
 ccagtgcag agcccttcc ccctaccgaa gagacttgc ggccttgc ccaactttct 3660
 acagaaaact ggaagccaaa ggatttggc agggtccggg gaaaattaag ctcattattc 3720
 gccgggatca ttttgttgcgag ggaaccttca atcaggttgc ggccttgc cggaaagagc 3780
 tccagcgaaa caagcttac gtcacccttgc ttggagagga gggcctggac tacagtggcc 3840

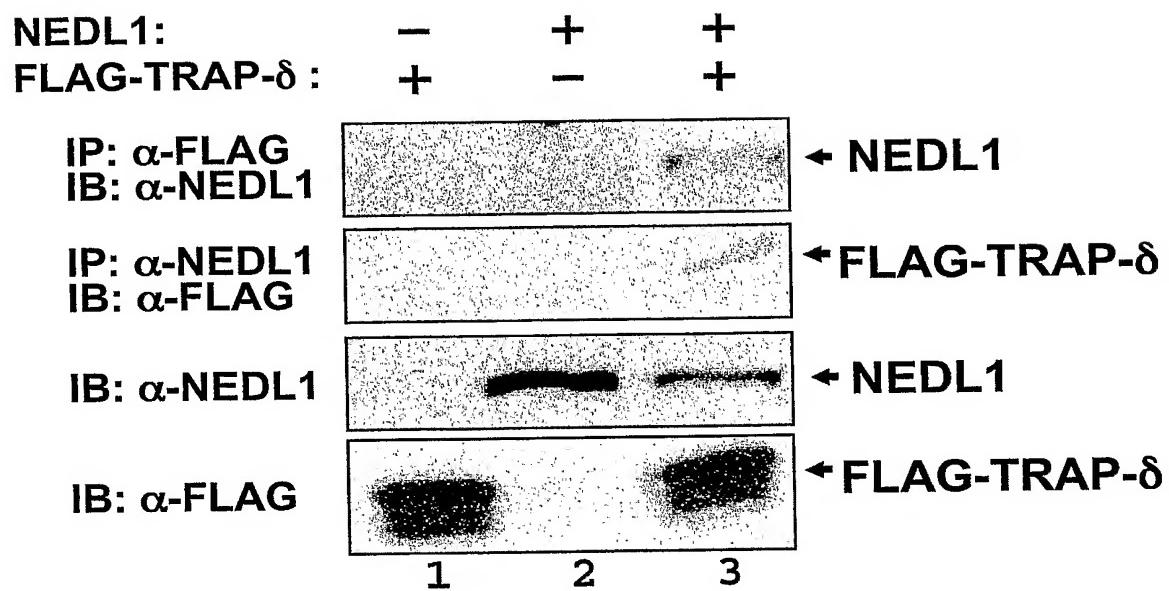
cctcgccgga gttcttcttc cttctgtctc aggagctctt caacccttac tatggactct 3900
 ttgagtactc ggcaaatgat acttacacgg tgcagatcag ccccatgtcc gcattttag 3960
 aaaaccatct tgagtggttc aggttagcg gtcgcacccct gggtctggct ctgatccatc 4020
 agtacccctc tgacgcttgc ttcacgaggc cttctacaa ggcactcctg agactgccct 4080
 gtgatttgag tgacctggaa tatttggatg aggaattcca ccagagttt cagtggatga 4140
 aggacaacaa catcacagac atcttagacc tcactttcac tgttaatgaa gaggttttg 4200
 gacaggtcac ggaaagggag ttgaagtctg gaggagccaa cacacaggtg acggagaaaa 4260
 acaagaagga gtacatcgag cgcatggta agtggcgggt ggagcgcggc gtgg tacagc 4320
 agaccgaggc gctggcgcgc ggcttctacg aggttgtaga ctcgaggctg gtgtccgtgt 4380
 ttgatgccag ggagctggag ctggtgatag ctggcaccgc ggaaatcgac ctaaatgact 4440
 ggccgaaataa cactgagttc cggggaggtt accacgatgg gcatcttgc atccgctgg 4500
 tctggctgc ggtggagcgc ttcaataatg agcagaggct gagattactg cagttgtca 4560
 cgggaacatc cagcgtgccc tacgaaggct tcgcagccct ccgtgggagc aatggccttc 4620
 ggcgcctctg catagagaaa tggggaaaaa ttacttctc ccccaggca cacacatgt 4680
 tcaaccgact ggatctcca ccgtatccct cgtactccat gttgtatgaa aagctgttaa 4740
 cagcagtaga ggaaaccagc acctttggac ttgagtgagg acatggaacc tcgcctgaca 4800
 tttccctgac cagtgacatc acccttccctg ggatgatccc ctttccctt tcccttaatc 4860
 aactctccctt tgattttggtt attccatgat tttattttca aacccaaatc aggattgaca 4920
 aaagctgtgc atgaagaact gccttcttct aagatctaactt cttcaggctt ctctcctctg 4980
 tttcaatga actgctagcc tgtatgcaat attaaaaaaac agctgtctca aggtctgtgt 5040
 atatctccac atacctccat tactaacaat gaaatatgaa tgcaagttaa gctacacttg 5100
 accaaatggt aataaatgtt tactccatt tctatcattt aaggaaaaat gtgagcatta 5160
 agcactccag gcttccat gccccatgtct tctgagcaga gccaccattt tttataattt 5220
 ctaataacca actccagaac taggagctga tcaactctt gtttccctt ccattactt 5280
 ttccctgtgc ataatatcca tccaaaggac aacagtggca aagctgaaat tttatacat 5340
 tcaactcatg attcacatgt ggcattcagtc ccatcagccg gaactagccct agacatacgg 5400
 tgcaaataatg acacttctaa cgattaacaa cagcaagaaa acacccgtct ctgatgcaat 5460
 gcaatgcac ccaatggttg tggggattgtt gggctcaact caagagaagt ttaggaggg 5520
 gagcatccct agtgaatact cacaccacaa gaaggacaaa cttgtgcaca tgtccaaagaa 5580
 agaaaagcttc ttgatttgagg tagcatgaag gatgaggctt cagccccat tgcattatgt 5640
 agaatgtggc aatgccaact ggagaaaggg aagaaggaca tattacccctt gtttgaatcc 5700
 ctgagttctg tactgttctg tttgttttag tctagccaca gttcttcaca aaggaaaaaaa 5760
 aaatgtgttag atgataccat gacittgtt aaagccatga ctttgtttt cttggcagac 5820
 aaaccctttt tttaaaactt tgatattttt tttcacatt tttttccctt ttcccttctt 5880
 aatcatggag ttcaagttcc tttgcattcg attgtccatc gggaccacac taggaagctg 5940
 cagagagtga tggtgctgt tagggatcaa gggcaacata gtacttctcc ttccacccata 6000
 gtaatccctcc tggggcagaa acataacacc ccaaaggcac gttgatttgtt atcaaaaataa 6060
 atatccagtt tcttttagca ttcaagtgaaa acatatctca gaaaacttca tgttgcaga 6120
 aaaacagctg caggctccaa agacagccta acctctcaac tacatttcaa ataaacccaa 6180
 ccataatggt aaaaaaaaaaa 6200

【書類名】図面
【図 1】

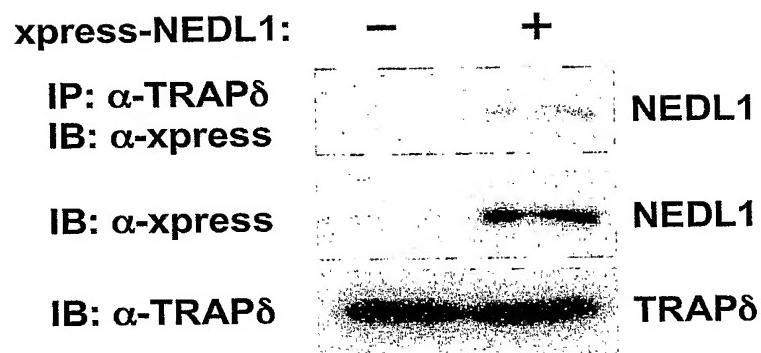
hNEDL1	MASPSRNSQSRRCKEPLRVSYNPQDFHNMDLRGGPHDGVTI PRSTS DTDLVTSRSRSTLMVSSSYI GHSQDLV1HWD I KEEVDAGDWIGHYL I DEV1	100
mNEDL1	MASPSRNSQSRRCKEPLRVSYNPQDFHN1D IRNGAHD1T1 PRSTS DTDLVTSRSRSTLMVSSSYI GHSQDLV1HWD I KEEVDAGDWIGHYL I GEVS	100
hNEDL1	SENFLDYKNRGVGNSHRGQ1IWK1DASSYFVEPETK1CFKYYHGVSGALRATTPSVTKNSA1P1FKS1GADETQVQGOSRR1I SFSLSDFQAMGLKKGM	200
mNEDL1	SENFLDYKNRGVGNSHRGQ1IWK1DASSYFVESETK1CFKYYHGVGRLRATTPSVTKNSA1P1FKG1GEETAQSQGOSRR1I SFSLSDFQAMGLKKGM	200
hNEDL1	FFNPDPYLK1S1OPGKHS1FPALPHIGQERRSK1I GNTVNP1WQAEQFSEVSLPTDVLE1EVOKFAKSRP1I KRF1LGKLSMPVQRLLERHA1GDRVSY	300
mNEDL1	FFNPDPYLK1S1OPGKHS1FPALPHIGQERRST1I GNTVNP1WQAEHFSFVSLPTDVLE1EVOKFAKSRP1I KRF1LGKLSMPVQRLLERHA1GDRVSY	300
C2 Domain		
hNEDL1	TLGRRLPTDHVGQLQFRFE1TSS1HPDDEE1SLSTEPES-AQ1QDSPMMNLMESGSGEPRSEAPESSESWKPEQLGEGSVPDRPGNQS1ELSPAAEEA	399
mNEDL1	TLGRRLPTDHVGQLQFRFE1TSS1HADDEE1SLSAEPESAETQDS1MNSMVGNSNGEPGSDATEFCKDAKPESPEGNGVNSENQNEHGPVEEAA	400
hNEDL1	V1TEAGDQGMVSVGPEGAGELAQVKD1Q PAPS AEE LAEQLDLGE EAS ALL LEDGE APAST KEEPLEEATT QSRAGREEEEKEQEEEGDVSTLEQEG-	499
mNEDL1	GAMEARDGSNVNSEAPEEPGELQDPPEQHDTQPTL SAEVAEGLPLD EDSPSSL PEENTALGSKVEEEVTPENGAREEEQMKGKD EEEEDVSTLEQEG-	499
hNEDL1	RLQLRASVKRKSRPCSLPVSELETVI ASACGDPETPRTHY1I HTLLHSMPSAQGSSAEEEDGAEEEESTLKSSEKDG LSEVDTVAADPSALEEDREP	599
mNEDL1	-----PELETVI ASACGDPETPRTHY1I HTLLHSMPSAORGSTEEEDGLEEESTLKESEKDG LSEVDTI AADPQSMEDGESDG	580
hNEDL1	EGATPGTAHPGHSGGHFPSSLANGAAQDGDTHTPSTGS ESDSSPRQGGDHSCEGCDASCSPCSCY STCYSSCCYASCYSPCSCYNGNRFA SHTRFS	699
mNEDL1	ATLCMAPSDCGGHFSSL SKG1GAGGDGEAHPTGS ESDSSPQGQGDHSCEGCDASCSPCSCY STCYSSCCYSSCCYNSCYN---GNNRFA SHTRFS	676
hNEDL1	SVDSAKI1SESTVFSSQDDEEEEENSAFESVPDSMQPELDPESTNGAPWQDELAQGHVERSPEGLESPVAGPSNRREGECP1LHNSQPVSQPLPSLRPE	799
mNEDL1	SVDSAKI1SESTVFSSQDDEEEEENSAFESVPDSVQSPLEDPESTNGAPWQDELAQPGNAARSTEGLESPMAGPSNRREGECP1LHNSQPISQPLPSLRPE	776
hNEDL1	HHHYPT1DEPLPPNWEAR1DSHGRVFYDHVNRTTTWQPTA1ATPDGMRRSG1Q QMEQLNRRYQNIQRT1ATERSEEDSGSQSCQAP-AGGGGGGS	898
mNEDL1	HHHYPA1DEPLPPNWEAR1DSHGRVFYDHVNRTTTWQPSM1APTDPGM1RSGSVHOMEQLNRRYQNIQRTMATERAEEDSGNQNSEQ1PDGGGGGGGS	876
WW Domain 1		
hNEDL1	DSEAESSQSSLRREGSLSPVNSQK1TLLLQSPAVKF1TNPEFTVLHANYSAYRVTSTSCLKHMI1LKVRDARNFERYQHNRDLVNF1NMFDATRE	998
mNEDL1	DSEAESSQSSLRREGSLSPVNSQKVTLQQSPAVKF1TNPEFTVLHANYSAYRVTSTSCLKHMI1LKVRDARNFERYQHNRDLVNF1NMFDATRE	976
hNEDL1	LPRGWE1KTQDGKSFVDOHNSRATT1DPR1PLQNGRLPNHLTHRQHQLRRLRSY SAGEASEVSRNRGASLLARP GHSVAA1RSQHQHESLPLAYDKI	1098
mNEDL1	LPRGWE1KTQDGKSFVGHNSRATT1DPR1PLQNGRLPNHLTHRQHQLRRLRSY SAGEASEVSRNRGASLLARP GHSVAA1RSQHQHESLPLAYDKI	1076
WW Domain 2		
hNEDL1	VAFLRQPNI FEMLQEROPS LARNTLREK1HY1RTEGNHGLEKLSCDA DLV1LLSLFEE1MSYVPLQAFHPGYSFSPRCSPCSPQNSPGLQRASARA	1198
mNEDL1	VAFLRQPNI FEMLQEROPS LARNTLREK1HY1RTEGNHGLEKLSCDA DLV1LLSLFEE1MSYVPLQAFHPGYSFSPRCSPCSPQNSPGLQRASARA	1176
hNEDL1	PSPYRRDFEAKL RNFYRKLEAKGFGQGP GK1KL1IRR DHLLLEGTFNQVMAYSRKELQRNKLYTVFVGEEGLD YSGPSREFFFLLSQELFNPYGLFEYSA	1298
mNEDL1	PSPYRRDFEAKL RNFYRKLEAKGFGQGP GKVKL1IRR DHLLLEGTFNQVMAYSRKELQRNKLYTVFVGEEGLD YSGPSREFFFLLSQELFNPYGLFEYSA	1276
hNEDL1	NDTYTVQ1SPMSAFVENHLEWFRFSGRI1GLGAL1HQYLLDAFFTRPFVKALLR LP CDSLSDLEYDEEFHQSLQWMKDNNT1D1DLTFTVNEEVFGQVTE	1398
mNEDL1	NDTYTVQ1SPMSAFVENHLEWFRFSGRI1GLGAL1HQYLPDAFFTRPFVYKGLLKLPCDSLSDLEYDEEFHQSLQWMKDNNT1D1DLTFTVNEEVFGQVTE	1376
hNEDL1	RELKSGGANTQVTEKNKKEY1ERMVKWRVERGVVQQTEALVRGFYEVVDSRLVSVF DAREELV1AGTAE1DLDNDRNNT EYRGYHDGLV1RWFWA AV	1498
mNEDL1	RELKSGGANTQVTEKNKKEY1ERMVKWRVERGVVQQTEALLRGF YEVVDSRLVSVF DAREELV1AGTAE1DLDNDRNNT EYRGYHDGLV1RWFWA AV	1476
hNEDL1	ERFNNEQRLRLQQFVTGTSSVPYEGFAALRGSGNGLRRFC1EKWGK1TSLPRAHTCFNRDLPPVPSYSMLYEKLTAVEETSTFGL	1585
mNEDL1	ERFNNEQRLRLQQFVTGTSSVPYEGFAALRGSGNGLRRFC1EKWGK1TSLPRAHTCFNRDLPPVPSYSMLYEKLTAVEETSTFGL	1563

HECT Domain

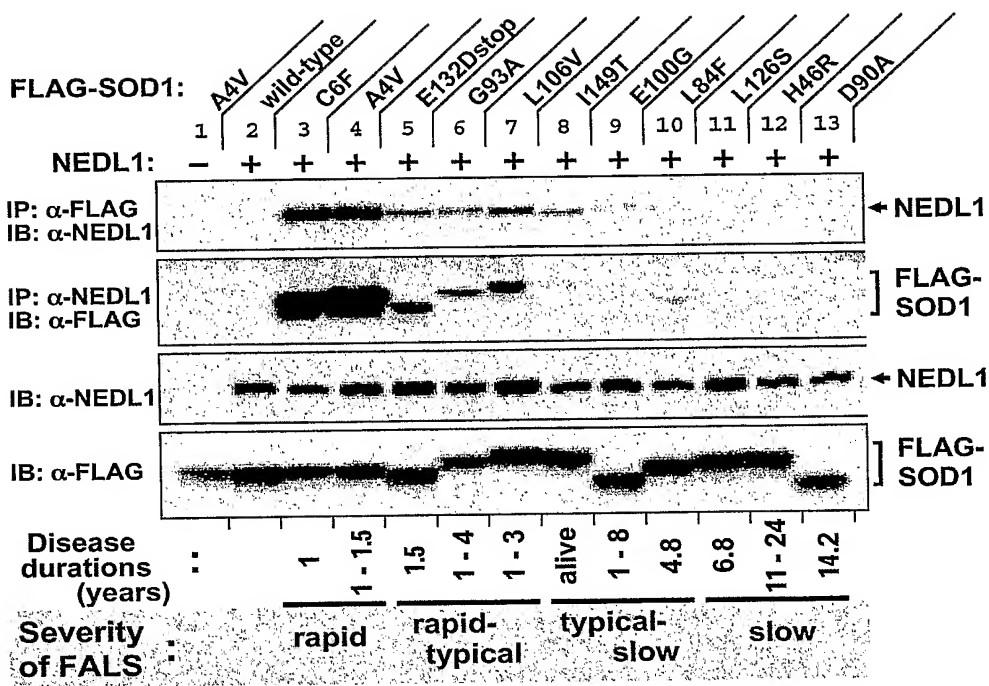
【図 2】



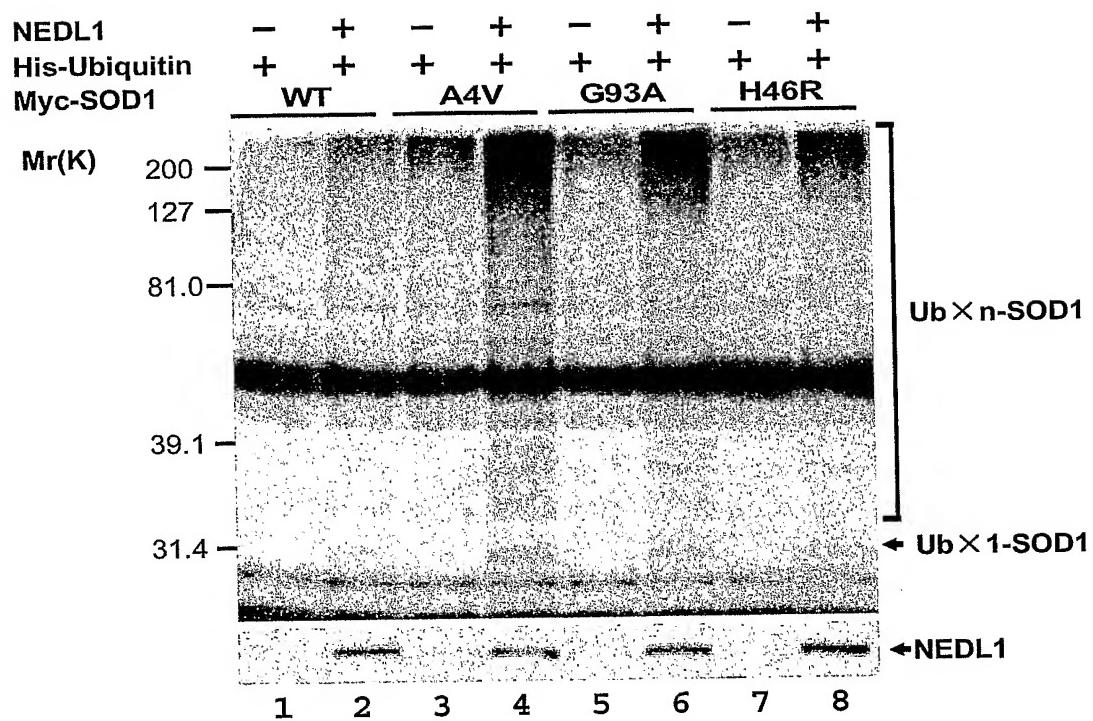
【図3】



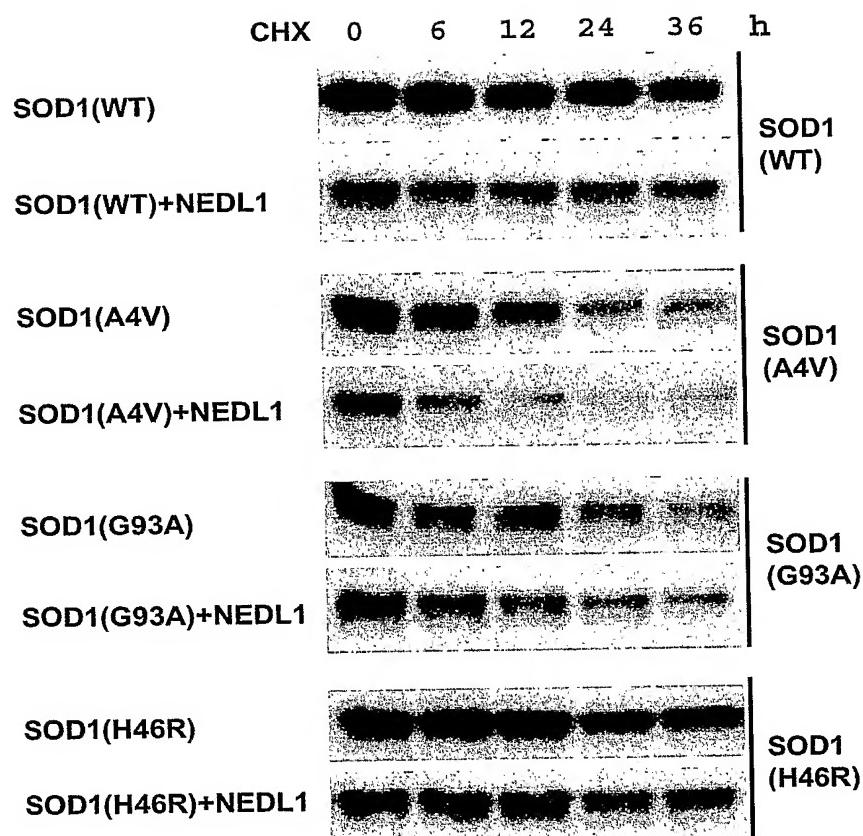
【図4】



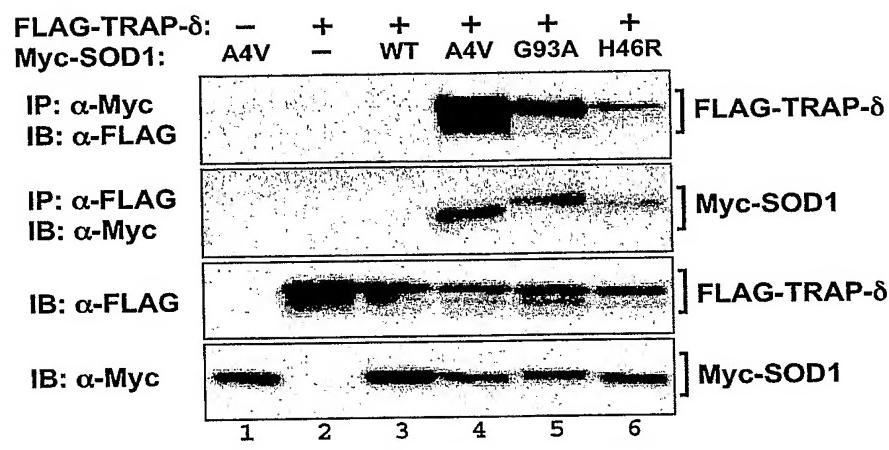
【図5】



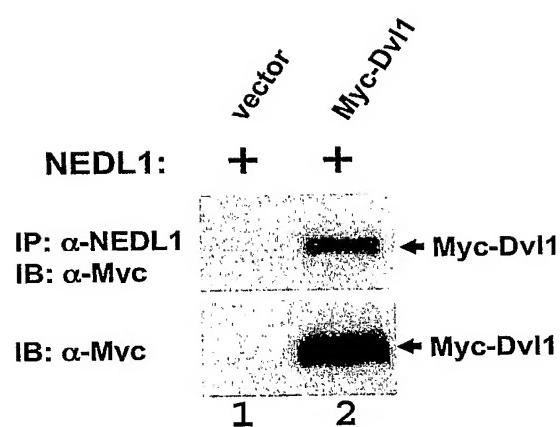
【図 6】



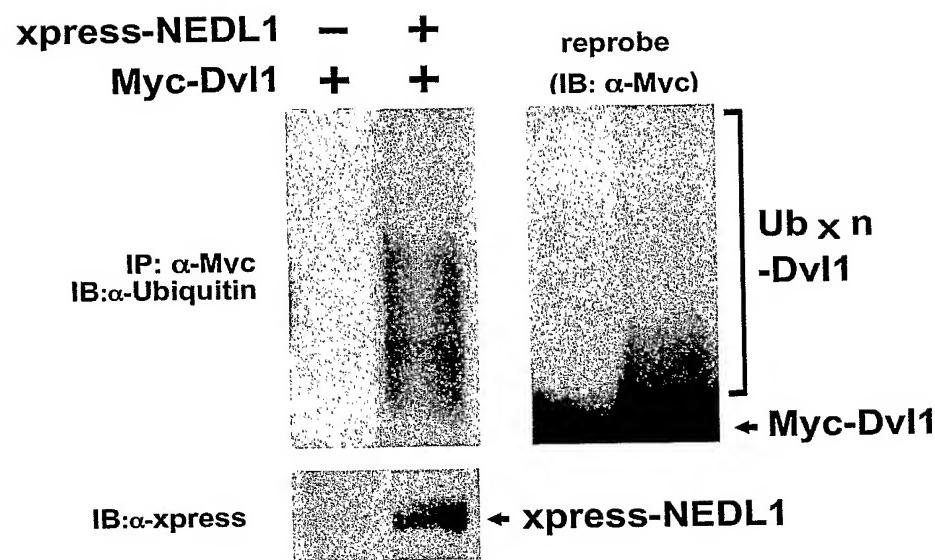
【図7】



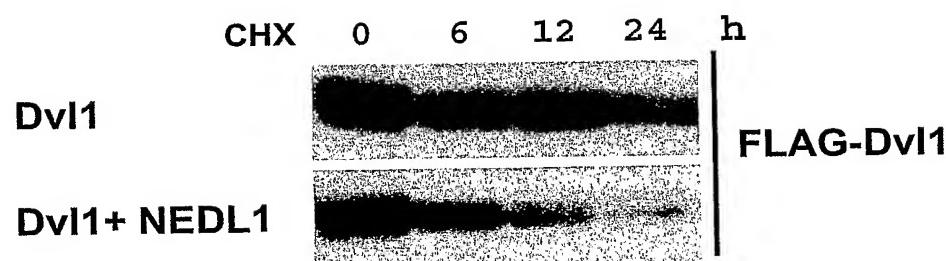
【図8】



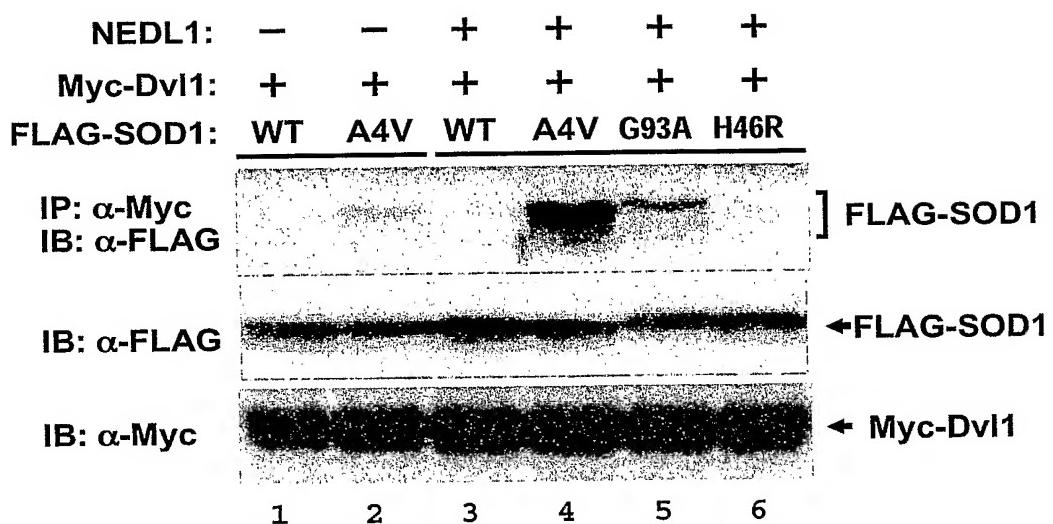
【図9】



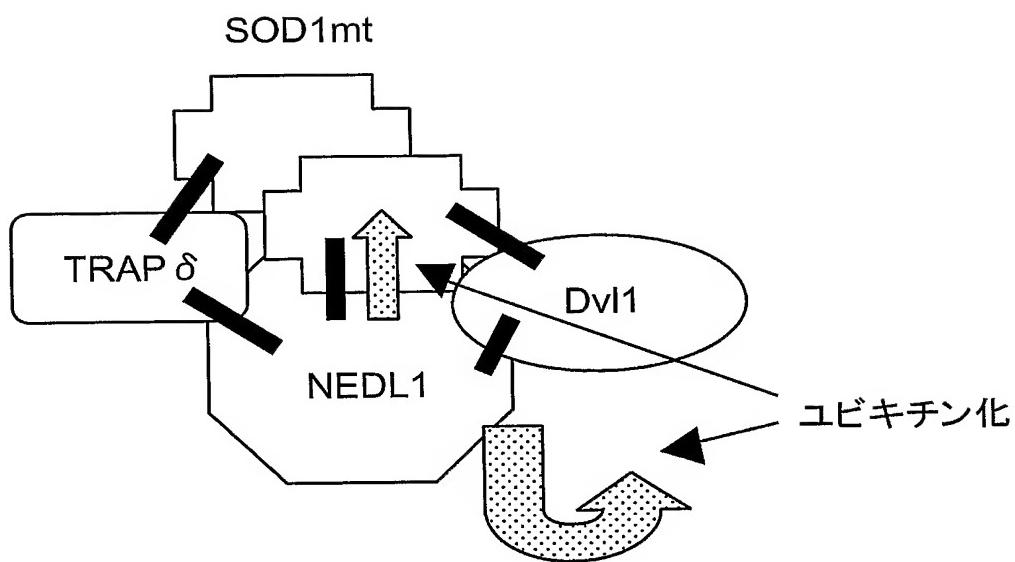
【図10】



【図11】



【図12】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 FALSの発症メカニズムとしての凝集体仮説を検証し、FALSの診断方法および診断薬を提供する。

【解決手段】 FALS患者由来の被検体からSOD1変異体を単離し、該SOD1変異体とNEDL1および／またはその関連分子であるTRAP δ またはDv11との結合能を評価して、FALSの臨床悪性度を判定する。

【選択図】 図12

【書類名】 出願人名義変更届
【提出日】 平成16年 7月14日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003-413629
【承継人】
【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区市場町1番1号
【氏名又は名称】 千葉県
【承継人代理人】
【識別番号】 100088155
【弁理士】
【氏名又は名称】 長谷川 芳樹
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 014708
【納付金額】 4,200円
【提出物件の目録】
【物件名】 承継人であることを証明する書面 1
【援用の表示】 平成16年7月14日付提出の特願2003-314345の出
願人名義変更届に添付の譲渡証書
【物件名】 委任状 1
【援用の表示】 平成16年7月14日付提出の特願2003-314345の出
願人名義変更届に添付の委任状

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-413629
受付番号	50401193238
書類名	出願人名義変更届
担当官	塩原 啓三 2404
作成日	平成 16 年 10 月 18 日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	591014710
【住所又は居所】	千葉県千葉市中央区市場町 1 番 1 号
【氏名又は名称】	千葉県
【承継人代理人】	申請人
【識別番号】	100088155
【住所又は居所】	東京都中央区銀座一丁目 10 番 6 号 銀座ファーストビル 創英國際特許法律事務所
【氏名又は名称】	長谷川 芳樹

特願 2003-413629

出願人履歴情報

識別番号 [000160522]

1. 変更年月日 1990年 9月13日

[変更理由] 新規登録

住所 佐賀県鳥栖市田代大官町408番地
氏名 久光製薬株式会社

特願 2003-413629

出願人履歴情報

識別番号 [591014710]

1. 変更年月日 1992年 9月 4日

[変更理由] 住所変更

住所 千葉県千葉市中央区市場町1番1号
姓 氏名 千葉県